

学校编码: 10384

分类号

密级

学号: 21620110153959

UDC

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

多环芳烃与海洋酸化对海洋鱼类的毒性
效应研究

Toxic effect of polycyclic aromatic hydrocarbons and ocean
acidification on marine fish

孙凌斌

指导教师姓名: 王 重 刚 教授

专 业 名 称: 动 物 学

论文提交日期: 2014 年 5 月

论文答辩时间: 2014 年 6 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 6 月

多环芳烃与海洋酸化对海洋鱼类的毒性效应研究

孙凌斌

指导教师: 王重刚教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

- () 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
- () 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

目 录	I
CONTENTS	VI
摘要	XI
ABSTRACT	XIII
第一章 前言	1
1.1 多环芳烃的污染现状和毒性效应	1
1.1.1 多环芳烃的理化特性	1
1.1.2 多环芳烃的污染现状	1
1.1.3 急性毒性	2
1.1.4 多环芳烃致癌、致畸和致突变性	2
1.1.5 多环芳烃在鱼体内的代谢过程和致毒机理	3
1.1.6 多环芳烃对鱼类的生殖影响	4
1.1.7 多环芳烃对鱼类的传代毒性的影响	5
1.2 原油污染的毒性效应	7
1.2.1 原油的污染现状	7
1.2.2 原油水溶性成分的化学组成	7
1.2.3 原油污染对海洋鱼类的影响	8
1.3 海洋酸化对海洋环境的影响	9
1.3.1 海洋酸化污染现状	9
1.3.2 海洋的碳酸盐系统	10
1.3.3 海洋酸化对海洋鱼类的影响	11
1.3.4 海洋酸化和原油水溶性成分对海水鱼类的联合毒性	13
1.4 鱼类性腺发育的调控与毒理学研究进展	13
1.4.1 鱼类性腺的功能形态学	13

1.4.2 性激素对鱼类性腺发育的调控	15
1.4.3 下丘脑—垂体—性腺轴	16
1.5 研究的对象、目的和意义	19
第二章 材料与方法	21
2.1 主要试剂	21
2.2 主要试剂配制	21
2.3 主要仪器	22
2.4 实验动物及其暴露实验	23
2.5 组织学分析	25
2.5.1 组织学切片和染色	25
2.5.2 组织学形态分析	26
2.6 相关基因表达的分析	26
2.6.1 组织总 RNA 的提取	26
2.6.2 1st cDNA 合成	27
2.6.3 实时荧光定量 PCR (Realtime-PCR, RT-PCR) 分析	27
2.7 生化指标分析	30
2.7.1 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GTP) 的测定	30
2.7.2 EROD 的测定	30
2.7.3 GST 的测定	31
2.8 脂质含量的分析	31
2.8.1 总脂质含量的测定	31
2.8.2 总胆固醇含量的测定	31
2.8.3 游离脂肪酸含量的测定	31
2.8.4 三脂酰甘油含量的测定	31
2.9 胚胎发育情况检测	32
2.9.1 孵化成功率	32
2.9.2 心搏率	32
2.9.3 孵化时间	32
2.9.4 产卵数量和受精成功率	32

2.10 胆汁中菲测定	33
2.11 组织中多环芳烃含量的测定	33
2.12 性腺中性激素水平测定	34
2.13 差异表达基因的生物信息学分析	35
2.13.1 褐菖鲉转录组序列的测定与分析	35
2.13.2 酸化和原油水溶性成分联合暴露基因芯片分析	36
2.14 数据处理	37
第三章 结果分析	38
3.1 多环芳烃菲对海洋鱼类褐菖鲉生殖毒性的影响	38
3.1.1 海洋鱼类褐菖鲉转录组测序分析	38
3.1.2 菲暴露对雄性褐菖鲉性体比的变化和组织学的影响	43
3.1.3 菲暴露对雄性褐菖鲉精子数量的影响	46
3.1.4 菲暴露对褐菖鲉精巢 γ -GTP 活性的影响	47
3.1.5 菲暴露对精巢性激素水平的影响	47
3.1.6 菲暴露对脑垂体性腺轴相关基因表达的影响	48
3.1.7 菲暴露对雄鱼脑中 EROD 活性和 GST 的影响	50
3.1.8 暴露后雄鱼脑和胆汁中菲的含量	51
3.1.9 菲暴露后雄鱼精巢凋亡情况	52
3.2 多环芳烃菲对黑点青鲈生殖毒性和传代毒性的影响	53
3.2.1 菲暴露对雌性青鲈生殖相关基因表达的影响	53
3.2.2 菲暴露对雄性青鲈生殖相关基因表达的影响	55
3.2.3 菲暴露对雌鱼产卵数量的影响	57
3.2.4 菲暴露对胚胎受精成功率的影响	58
3.2.5 菲暴露对胚胎出膜成功率和出膜时间的影响	58
3.2.6 菲暴露对子代胚胎心跳速率的影响	59
3.2.7 菲暴露对刚出膜仔鱼 swim-up 能力的影响	60
3.2.8 菲在母代组织和子代胚胎中的残留	61
3.3 原油水溶性成分和海洋酸化对海洋鱼类联合效应	63
3.3.1 酸化和原油水溶性成分联合暴露对仔鱼体长的影响	63

3.3.2 酸化和原油水溶性成分联合暴露对仔鱼组织结构的损伤	63
3.3.3 酸化和原油水溶性成分联合暴露对仔鱼组织损伤的定量	68
3.3.4 酸化和原油水溶性成分联合暴露对仔鱼肝脏的油红染色	68
3.3.5 酸化和原油水溶性成分联合暴露对脂质生成相关基因的影响	69
3.3.6 酸化和原油水溶性成分联合暴露对胚胎出膜率和出膜时间的影响	72
3.3.7 酸化和原油水溶性成分联合暴露对水体 pH 和溶解氧的改变	73
3.3.8 酸化和原油水溶性成分联合暴露对胚胎心跳速率的影响	74
3.3.9 酸化和原油水溶性成分联合暴露对水体 pH 和溶解氧的改变	74
3.3.10 原油水溶性成分中石油烃的含量	75
3.3.11 原油水溶性成分中 PAHs 的含量	76
3.3.12 酸化和原油水溶性成分基因芯片分析	77
第四章 讨论	82
4.1 多环芳烃菲对海洋鱼类生殖毒性的影响	82
4.1.1 海洋鱼类褐菖鲉转录组测序分析	82
4.1.2 多环芳烃菲在鱼体内的代谢和解毒过程	83
4.1.3 多环芳烃菲对雄性褐菖鲉精巢发育影响	85
4.1.4 多环芳烃菲对雌性鱼类生殖发育的抑制和传代毒性的影响	87
4.2 低浓度多环芳烃 PHE 的毒物兴奋效应	89
4.2.1 毒物兴奋效应 (hormesis) 的定义	89
4.2.2 毒物兴奋效应的发展过程	90
4.2.3 毒物兴奋效应的特征	91
4.2.4 毒物兴奋效应的机制	91
4.2.5 低浓度多环芳烃 PHE 暴露引起的毒物兴奋效应 (hormesis)	92
4.3 海洋酸化和原油水溶性成分对海洋鱼类联合毒性的影响	93
4.3.1 海洋酸化和原油水溶性成分对海洋鱼类的协同作用	93
4.3.2 海洋酸化和原油水溶性成分对海洋鱼类组织结构的损伤	95
4.3.3 海洋酸化与及其他环境胁迫因子对海洋环境的影响	96
第五章 结论与展望	98
5.1 结论	98

5.2 本研究的创新点和贡献·····	98
5.3 展望·····	99
参考文献 ·····	100
缩略词对照表 ·····	112
攻读博士阶段发表的论文和参加的课题 ·····	114
致 谢 ·····	115

CONTENTS

Abstract (In Chinese)	XI
Abstract (In English)	XIII
Chapter 1 Introduction	1
1.1 The study of PAHs pollution and toxic mechanism	1
1.1.1 The characters of PAHs	1
1.1.2 The pollution study of PAHs	1
1.1.3 Actual toxicity of PAHs	2
1.1.4 Carcinogenicity of PAHs	2
1.1.5 Metabolic process and toxic mechanism of PAHs in fish	3
1.1.6 Reproductive toxic effects of PAHs in fish	4
1.1.7 Transgenerational toxicity of PHE in fish	5
1.2 The toxicities of crude oil	7
1.2.1 The pollution study of crude oil	7
1.2.2 Chemical composition of water soluble fraction of crude oil	7
1.2.3 Toxic effects of crude oil in fish	8
1.3 The effects of ocean acidification on marine environment	9
1.3.1 The pollution study of ocean acidification	9
1.3.2 Marine carbonate system	10
1.3.3 The influence of ocean acidification on marine fish	11
1.3.4 The combined effect of ocean acidification and water-soluble fraction of crude oil on the joint toxicity in fish	13
1.4 Fish reproduction regulation and progress in research of reproduction	13
1.4.1 The functional morphology of teleost gonads	13
1.4.2 Sex hormones in gonad development of fish	15
1.4.3 The hypothalamus-pituitary-gonad axis	16
1.5 Research objectives and significance	19

Chapter 2 Materials and methods	21
2.1 Solutions	21
2.2 Major solution configuration	21
2.3 Apparatus	22
2.4 Animals and toxicological experiments	23
2.5 Histological analysis	25
2.5.1 Histological sectioning and staining	25
2.5.2 Analysis of tissue characterizations with comparison to histological sections	26
2.6 The analysis of the related gene expression	26
2.6.1 Total RNA extraction	26
2.6.2 1st Strand cDNA Synthesis	27
2.6.3 Real time quantitative PCR	27
2.7 Biochemical analysis	30
2.7.1 Analysis of the activity of γ -GTP	30
2.7.2 Analysis of the activity of EROD	30
2.7.3 Analysis of the activity of GST	31
2.8 The analysis of the lipid content	31
2.8.1 The content of total lipid	31
2.8.2 The content of cholesterol	31
2.8.3 The content of free fatty acid	31
2.8.4 The content of triglyceride	31
2.9 The analysis of the embryonic development	32
2.9.1 Hatch success	32
2.9.2 Heart rates	32
2.9.3 The time to hatch	32
2.9.4 egg number and fertilization success	32
2.10 Analysis of the PHE concentration in bile	33
2.11 Analysis of the contents of polycyclic aromatic hydrocarbons in the samples	33

2.12 Analysis of the sexual steroid level in gonad	34
2.13 Genomes and Transcriptomes analysis	35
2.13.1 Transcriptome Analysis of Male and Female <i>S. marmoratus</i>	35
2.13.2 cDNA microarray data analysis	36
2.14 Statistical analysis	37
Chapter 3 Results	38
3.1 Effects of PHE on reproductive development of male <i>S. marmoratus</i>	38
3.1.1 Transcriptome analysis of male and female <i>Sebastiscus marmoratus</i>	38
3.1.2 GSI and Histological Examination	43
3.1.3 Percentage of spermatocysts at different stages of development	46
3.1.4 γ -GTP activity in the testes of male <i>S. marmoratus</i>	47
3.1.5 Sex hormone levels in the testes of male <i>S. marmoratus</i>	47
3.1.6 The BPG related gene expression analysis	48
3.1.7 EROD and GST activity in the brain of male <i>S. marmoratus</i> treated with PHE	50
3.1.8 Phenanthrene (PHE) accumulation in the brain and bile	51
3.1.9 Cell apoptosis in testes after exposure to PHE	52
3.2 Reproductive and transgenerational toxicity of phenanthrene on female marine medaka (<i>Oryzias melastigma</i>)	53
3.2.1 The BPG-related gene expression analysis in female medaka	53
3.2.2 The BPG-related gene expression analysis in male medaka	55
3.2.3 Effect of PHE exposure on egg size	57
3.2.4 Effect of PHE exposure on fertilization success	58
3.2.5 Effect of PHE exposure on hatch success and the time to hatch	58
3.2.6 Effect of PHE exposure on heart rates of F1 generation	59
3.2.7 Effect of PHE exposure on swim-up success of F1 generation	60
3.2.8 Phenanthrene (PHE) accumulation in the tissue and embryo	61
3.3 Combined effect of water soluble fraction of crude oil and ocean acidification on the marine fish	63

3.3.1 Effects of combined exposure on larval length	63
3.3.2 Severe tissue damage in medaka under the combined exposure	63
3.3.3 Quantification of degree of damage in various organs	68
3.3.4 Histological changes of the livers stained with Oil Red O	68
3.3.5 Lipid content of larval cod for 19 d and 30 d after fertilization	69
3.3.6 The mRNA expression of lipid metabolism associated genes in the larval medaka for 19 d and 30 d	72
3.3.7 Change of hatch ability and time to hatch caused by WSF and CO ₂ exposure	73
3.3.8 Heart rates of embryo caused by WSF and CO ₂ exposure	74
3.3.9 Measurement of pH and dissolved oxygen	74
3.3.10 Concentrations of alkanes from the control and WSF treatments	75
3.3.11 Concentrations of PAHs from the control and WSF treatments	76
3.3.12 Microarray analysis	77
Chapter 4 Discussion	82
4.1 Reproductive and transgenerational toxicity of phenanthrene	82
4.1.1 Transcriptome analysis of male and female <i>Sebastiscus marmoratus</i>	82
4.1.2 Metabolic and detoxification process of PHE in fish	83
4.1.3 Effects of PHE on reproductive development of male fish	85
4.1.4 Effects of PHE on reproductive development of female fish	87
4.2 The hormesis: the impact of low doses of PAH on fish reproduction	89
4.2.1 Hormesis defined	89
4.2.2 History of the hormesis	90
4.2.3 Characteristics of the hormesis	91
4.2.4 Mechanism of the hormesis	91
4.2.5 The hormesis: the impact of low doses of PAH on fish reproduction	92
4.3 Combined effect of water soluble fraction of crude oil and ocean acidification on the marine fish	93
4.3.1 Synergistic effect of water soluble fraction of crude oil and ocean	

acidification	94
4.3.2 Severe tissue damage in medaka under the combined exposure	95
4.3.3 Synergistic effect of ocean acidification and other environmental stress factors on marine environment	96
Chapter 5 Conclusions and Prospective	98
References	100
Abbreviation	112
Publications and Projects	114
Acknowledgement	115

中文摘要

多环芳烃菲是一类环境中常见的持久性有机污染物。低环数的多环芳烃对海洋鱼类生殖机能的影响报道很少。采用三环的菲 (PHE) (0、0.06、0.6 和 6 $\mu\text{g/L}$) 暴露 50 天后, 雄性褐菖鲉 (*Sebastiscus marmoratus*) 性体比指数和精子的比例随着浓度升高呈现 U 形曲线的变化。通过转录组学和 Real-time PCR 技术, 测定褐菖鲉与生殖相关基因的 mRNA 表达情况。在菲的暴露组, 促性腺激素释放激素、促卵泡激素、促黄体激素的 mRNA 水平, 雌激素含量和 γ -谷氨酰转肽酶活性都显示一个 U 形的剂量反应, 在 0.06, 0.6 $\mu\text{g/L}$ 浓度组这些指标发生显著地变化, 而在 6 $\mu\text{g/L}$ 没有显著变化。脑中谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 活性呈 U 形变化, 这导致脑中的 PHE 的积累呈倒 U 形。PHE 在大脑中生物转化可能是生殖过程中引起毒物兴奋效应的原因。我们的结论清楚地解释了环境浓度 PHE 暴露后引起精子发生的 U 形剂量效应, 并阐明了作用途径。

在雌性黑点青鳉 (*Oryzias melastigma*) 从出膜后一个月开始到性成熟为期 80 天菲 (0、0.06、0.6、6 和 60 $\mu\text{g/L}$) 的暴露实验中, 0.06、0.6 和 60 $\mu\text{g/L}$ PHE 抑制卵巢的发育, 产卵频率和产卵数量的减少, 影响卵子质量和 F1 代胚胎发育心率的异常, 降低 F1 代仔鱼的出膜率和出膜后的正常游动。雌鱼脑-垂体-性腺轴和肝脏中与生殖相关基因 mRNA 的表达量呈现 U 形的剂量反应, 而脑中的 PHE 的积累呈倒 U 形。进一步验证 PHE 在脑中生物转化可能是生殖过程中引起毒物兴奋效应的原因。另外, PHE 对母代黑点青鳉进行暴露, 会引起子一代的 U 形毒性效应。因为在胚胎中可以检测到非常低的 PHE, 所以推测暴露引起的传代毒性是体内残留的 PHE 和胚胎中的营养物质 (卵黄蛋白原) 缺乏而导致子代的传代毒性。

这一结果为菲暴露后海洋鱼类生殖健康的风险评估带来了困难和挑战。到目前为止, 关于低剂量的激素、药物、污染物等引起的毒物兴奋效应还没有一个完整的理论可以解释。在本实验中, 脑中菲的累积呈倒 U 形曲线, 而大脑中与菲代谢相关的 GST 活性呈 U 形的剂量反应。这些结果给菲暴露引起的 U 形的剂量效应一个合理的解释: 通过菲在大脑中累积影响解毒酶活性的变化进而引起生殖的抑制和传代毒性。

海洋酸化,是由于人类自身的生产活动使排放到空气中的二氧化碳含量升高而导致 pH 值下降。预测未来一百年后海水中 pH 进一步下降 0.3-0.4 个 pH 单位,海洋酸化和原油污染两者联合暴露对海洋鱼类的研究还很少。因此,为了探讨在海洋酸化对鱼类的胁迫作用以及海洋酸化与原油水溶性成分的联合毒性作用,本实验通过酸化和原油水溶性成分的联合暴露,探讨两者对黑点青鲷仔鱼的联合毒性作用。通过对组织损伤的量化统计,可以发现酸化会引起肝脏、肠道和胰腺的脂质空泡和肾脏、眼睛的结构变化,在酸化和原油水溶性成分的联合处理后会明显增强仔鱼的损伤程度。通过脂质含量的测定,在联合暴露下的脂质(总脂质、三脂酰甘油、游离脂肪酸和总胆固醇)含量明显高于对照组以及其它的单独暴露组。我们认为仔鱼组织中的脂质空泡和仔鱼的脂质累积与酸化相关,而联合暴露后加重了仔鱼组织的损伤。仔鱼的过氧化物酶增殖物激活受体(peroxisome proliferators activated receptor, PPARs)和维甲类 X 受体(retinoid X receptors, RXRs)基因表达水平的上调可能是酸化引起脂质累积的原因。由于胚胎和仔鱼阶段不具备完整的酸碱调控系统,因此海洋鱼类早期阶段更容易受到 pH 变化的影响,这一结果为评估海洋酸化以及在原油污染情况下特别是对海洋鱼类早期生活阶段的影响,提供了重要参考。

关键词: 多环芳烃 脑-垂体-性腺轴 生殖毒性 毒物兴奋效应 海洋酸化 原油污染 组织损伤 脂质积累

ABSTRACT

Phenanthrene is one of the most abundant polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. So far, few reports have been published concerning that reproductive inhibit of polycyclic aromatic hydrocarbons. Our research showed that reproductive and transgenerational toxicity of phenanthrene on male and female rock fish (*Sebastiscus marmoratus*): hormetic dose-response and the reason. After 50 days exposure, the gonadosomatic indices of the testis and percentage of sperm produced showed a U-shaped dose response. The levels of salmon-type gonadotropin releasing hormone, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone mRNA, 17β -estradiol, and γ -glutamyltranspeptidase activity were all reduced significantly from 0.06 and 0.6 $\mu\text{g/L}$ PHE exposure as compared with the control. Glutathione S-transferase activity in the brain showed a U-shaped dose-response, which was related with PHE accumulation. Those dates clearly demonstrated the U-shaped effects of PHE exposure on spermatogenesis and also elucidated the action pathway.

Marine medaka (*Oryzias melastigma*) was exposed to PHE (0、0.06、0.6、6 和 60 $\mu\text{g/L}$) for 80 days. PHE exposure suppressed the spawning frequency, egg number, egg quality; induced swim-up failure, mortality, and cardiac arrhythmia in the F1 generation. Time to hatch and swim-up success are inhibited by PHE. The expression of genes related with the brain–pituitary–gonadal (BPG) axis and vitellogenin production were all showed a U-shaped dose response, which clearly demonstrated the hormesis of PHE exposure on reproductive development and also elucidated the action pathway. Besides, PHE exposure to marine medaka resulted in a hormetic dose response of F1 generation. The transgenerational toxicity of PHE on medaka could be induced by PHE accumulation in embryo and lack of vitellogenin.

This result would bring a difficulty and a challenge to any risk assessment of PHE exposure to the reproductive health of fishes. Therefore, it is important that a reexamination of PHE low-dosage effects include a discussion of the requirement for

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库